

## PREPARATION OF ERYTHROPOIETIN-PRODUCING CELL

**Publication number:** JP62198388 (A)

**Publication date:** 1987-09-02

**Inventor(s):** UEDA MASAJI; AKAI KUNIHISA; MURAKAMI MASAHIKO;  
CHIBA HIDEO; SASAKI RYUZO +

**Applicant(s):** SNOW BRAND MILK PROD CO LTD +

**Classification:**



- international: **C07K14/505; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/85; C12N5/00;  
C12N5/10; C12P21/00; C12P21/02; C12R1/91; C07K14/435;  
C12N15/00; C12N15/09; C12N15/85; C12N5/00; C12N5/10;  
C12P21/00; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/00; C12N5/00;  
C12P21/00; C12R1/91**

- European: C07K14/505; C12N15/85

**Application number:** JP19860042275 19860227

**Priority number(s):** JP19860042275 19860227

**Also published as:**

 JP6102035 (B)  
 JP1967994 (C)

### Abstract of JP 62198388 (A)

**PURPOSE:**To prepare an erythropoietin-producing cell, by introducing a mixed vector of an erythropoietin transducing vector and selected marker gene transduced vector into a mouse L929 cell using a specific technique. **CONSTITUTION:**An aminoglycoside 3'-phosphotransferase gene (neo gene) derived from Tn which is a selected marker is inserted into the downstream of SV40 early gene of a shuttle vector pKSV-10 to prepare a selected marker neo<r> gene transduced vector pKSVNeo, which is then mixed with an erythropoietin transducing vector pSVhEPX. The resultant mixed vector is further introduced into a mouse L929 cell by a DNA transfection technique using calcium phosphate to prepare the aimed erythropoietin-producing cell.

.....  
Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-198388

⑮ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和62年(1987)9月2日
C 12 N 5/00		7115-4B	
		7115-4B	
// C 12 P 21/00		6712-4B	
(C 12 N 5/00			
C 12 R 1:91)			
審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)			

⑭ 発明の名称 エリスロポエチン産生細胞の作成方法

⑯ 特 願 昭61-42275

⑰ 出 願 昭61(1986)2月27日

⑱ 発 明 者 上 田 正 次 川越市今福1672の1の719  
 ⑱ 発 明 者 赤 井 邦 久 宇都宮市東宿郷3-4-7 政邦コーポ304  
 ⑱ 発 明 者 村 上 晶 彦 宇都宮市東宿郷3-4-7 政邦コーポ305  
 ⑱ 発 明 者 千 葉 英 雄 宇治市広野町新成田100-131  
 ⑱ 発 明 者 佐々木 隆 造 京都市左京区田中高原町14  
 ⑲ 出 願 人 雪印乳業株式会社 札幌市東区苗穂町6丁目1番1号  
 ⑳ 代 理 人 弁理士 宮田 広豊

## 明 細 書

## 方法。

## 1. 発明の名称

エリスロポエチン産生細胞の作成方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) エリスロポエチン遺伝子を哺乳動物細胞用シヤトルベクター-pKSV-10 のSV40初期遺伝子プロモーターの下流に挿入することによりエリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX を作成し、一方選択マーカーのTn由来のアミノグリコシド3'-ホストトランスフェラーゼ遺伝子(neo遺伝子)をシヤトルベクター-pKSV-10 のSV40初期遺伝子の下流に挿入することにより選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo を作成し、得られたエリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX と選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo を混合したベクターを、リン酸カルシウムを用いるDNAトランスフェクションの手法により、マウスL929細胞へ導入することとを特徴とするエリスロポエチン産生細胞の作成

(2) エリスロポエチン遺伝子は、全エリスロポエチンゲノム遺伝子を、プラスミドpUC8の制限酵素EcoRI 及びSmaIによる切断部位に挿入したプラスミドpBEP1425を用いて制限酵素 Bgl II 及び BamHI で切断して分離したものである特許請求の範囲第(1)項記載の作成方法。

(3) エリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX の作成を、エリスロポエチン遺伝子をシヤトルベクター-pKSV-10 の制限酵素 Bgl II による切断部位に挿入した後、上記シヤトルベクター-pKSV-10 のSV40の初期遺伝子プロモーターの下流にエリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して行なうものである特許請求の範囲第(1)項記載の作成方法。

(4) 選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター-pKSVNeoの作成を、選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含むプラスミドpNEOを制限酵素Hind IIIで切断した後、Klenow酵素で5'突起部位を修復し、

次いで BamHI リンカーを接続した後、制限酵素 BamHI で切断した neo 遺伝子断片を、シヤトルベクター-pKSV-10 の制限酵素 Dgl II による切断部位に挿入し、上記シヤトルベクター-pKSV-10 のSV40の初期遺伝子プロモーターの下流に neo 遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図分析により選択して行なうものである特許請求の範囲第(1)項記載の作成方法。

- (5) エリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhBPX と選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター-pKSV Neo を10:1の割合で混合する特許請求の範囲第(1)項記載の作成方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、造血因子、すなわち、赤血球生成促進因子であるエリスロポエチン（ヒト・エリスロポエチン）の産生能を有する動物細胞の作成方法に関する。

#### 従来の技術的背景

赤血球産生の亢進効果が確認されている（Masunaga H. et al. 「Acta Hematol Jpn in press」(アクト ヒマトロジイ ジャパン インプレス)）。

したがって、エリスロポエチンは、臨床上の応用として腎疾患者の貧血治療、腎摘出後の血液透析患者の貧血防止、手術後患者の赤血球産生増進による回復促進等への適応が可能な医薬に用いられる。

而して、エリスロポエチンは、上述のように臨床貧血治療への応用が期待されるものの、医薬としての高純物のものを大量に供給することが困難であるため、医薬品として開発は遅れているのが現状である。すなわち、エリスロポエチンは再生不良性貧血患者の尿中に含まれていることから、従来は、該尿から分離、採取して精製したものを試験研究に用いられるにすぎなかつた。

このような状況に鑑み、本発明者等は、最近エリスロポエチンで免疫した実験動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを細胞融合させたハイブリドー

エリスロポエチンは、骨髓に存在する赤血球系前駆細胞(CFU-E)に作用して、赤血球細胞への分化を促進する赤血球生成促進因子であつて、ヒト・エリスロポエチンの物性は下記のとおり報告されている。

ヒト・エリスロポエチンは、分子量35,000を有する糖タンパク質であつて、〔Vanagawa S. et al. 「J. Biol. Chem.」(ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリイ)、259、2707-2710 (1984)〕、そのペプチド部分は166個のアミノ酸より成る1本鎖ポリペプチドである〔Jacob K. et al. 「Nature」(ネーチャ)、313、806-810 (1985)〕とそれぞれ報告されている。

また、ヒト・エリスロポエチンの cDNA 及びゲノムDNAの構造も上記 Jacob K. 等の報告にみられるとおり明らかにされている。

また、エリスロポエチンの臨床的効用については、貧血患者の尿より採取して純化した標品を用いての動物実験に基づいて、エリスロポエチンの

マより得られるモノクローナル抗エリスロポエチン抗体を結合した吸着剤を用いることにより、貧血患者尿から純粋なエリスロポエチンを高収率で製造する方法を開発した(特開昭60-41614号)。

しかし、上記方法によるも原料としての上記尿の供給が制限されるため、エリスロポエチンを大量に生産して医薬として定常的に供給することは困難とされる。

したがって、エリスロポエチンを貧血治療用医薬とするには遺伝子工学的手法を利用した技術を確立する必要があると考えられている。

#### 発明が解決しようとする問題点

本発明者は、エリスロポエチン生産上の上述した問題点に鑑みなされたものであつて、遺伝子工学的手法を利用することによりエリスロポエチン生産細胞を作成する方法を提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、貧血患者尿を原料としてエリスロポエチンを製造する従来法の問題点であ

つた原料上の制約を解消して、エリスロポエチンを大量生産方式で製造することを可能とするものである。

本発明者は、エリスロポエチン遺伝子を、特別に作成したベクターを介してマウスL929細胞へ導入することにより、エリスロポエチンを恒常的に産生する細胞を作成することに成功し、本発明をなすに至つた。以下本発明を詳しく説明する。

#### 発明の構成

本発明に係るエリスロポエチン産生細胞の作成方法の特徴は、エリスロポエチン遺伝子を、哺乳動物細胞用シヤトルベクター-pKSV-10のSV40初期遺伝子プロモーターの下流に挿入することによりエリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhEPXを作成し、一方選択マーカーのTn由来のアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo遺伝子)をシヤトルベクター-pKSV-10のSV40初期遺伝子の下流に挿入することにより選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクター-pKSVNeoを作成し、得

挿入したプラスミドpHEP 1425を用い、該プラスミドpHEP 1425を制限酵素Bgl II及びBamHIで切断してエリスロポエチン遺伝子を分離し、該エリスロポエチン遺伝子を、哺乳動物細胞用のシヤトルベクター-pKSV-10の制限酵素Bgl IIによる切断部位に挿入した後、該シヤトルベクター-pKSV-10のSV40の初期遺伝子プロモーターの下流にエリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られたものをエリスロポエチン形質導入ベクターとする。なお、本ベクターの動物細胞におけるエリスロポエチン遺伝子の発現は、COS細胞におけるトランジェントエクスペリメンテーションにより確認し得る。

選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクターの作成：

選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子を含むプラスミドpNEOを制限酵素Hind IIIで切断した後、Klenow酵素(DNAポリメラーゼI)で5'突起を修復し、次いでBamHIリンカーを接続した後、制限酵素BamHIで切断したneo遺伝子(1946 bp)断片を

られたエリスロポエチン形質導入ベクター-pSVhEPXと選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクター-pKSVNeoを混合したベクターを、リン酸カルシウムを用いるDNAトランスフェクションの手法によりマウスL929細胞へ導入することにある。

すなわち、本発明は、エリスロポエチン遺伝子導入ベクターと選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクターをそれぞれ作成し得られた両ベクターのコートランスフェクション手法により、エリスロポエチン遺伝子をL-929細胞へ導入してエリスロポエチン産生細胞を取得するものである。

#### 問題点を解決するための手段

本発明では、まず、下記手順に従つてエリスロポエチン形質導入ベクターと選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクターをそれぞれ作成する。

エリスロポエチン形質導入ベクターの作成：

ヒト・ゲノムDNAライブラリーから入手した全エリスロポエチンゲノム遺伝子を、プラスミドPUC 8の制限酵素EcoRIとSmaIによる切断部位に

シヤトルベクター-pKSV-10のBgl IIによる切断部位に挿入して、該シヤトルベクター-pKSV-10のSV40の初期遺伝子プロモーターの下流にneo遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られたものを選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクターとする。

なお、本ベクターの動物細胞におけるneo遺伝子の発現は、L929細胞へのneo遺伝子の形質導入を行ない、G418耐性細胞の生成により確認し得る。エリスロポエチン遺伝子のL929細胞への導入：

本発明では、次いで上述のようにして作成したエリスロポエチン形質導入ベクターと選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクターとを混合したベクターをリン酸カルシウムを用いるDNAトランスフェクション手法(コートランスフェクション法)によりマウスL929細胞へエリスロポエチン遺伝子を導入する。上記ベクターの混合はエリスロポエチン形質導入ベクターと選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子導入ベクターを10:1の割合で行なうのが好ましい。

エリスロポエチン産生細胞の作成:

上述のようにしてエリスロポエチン遺伝子を導入したL929細胞は上記トランスフェクションの3日後に約6倍に希釈して培地に接種して培養し、接種の翌日以降G418を培養液に添加して2週間培養を行ない、G418耐性細胞(選択マーカー形質導入細胞)を選択した後、培養液中にエリスロポエチンを放出している細胞を選択した。次いで、この選択細胞について限界希釈法でエリスロポエチン遺伝子を発現している細胞をクローニングした後、上記発現の高いものを選択し、1ヶ月間継代培養を行ない、エリスロポエチンを恒常的に生産する細胞株L-929-SVhEPを樹立する。

なお、上記細胞株により産出されるエリスロポエチンはラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いたin vitro バイオアッセイ法により確認し得る。以下に実施例を示して本発明を更に具体的に説明する。

水層を集め、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出により水層に含まれるフェノールを除去した後、2倍量のエタノールを加え、DNA断片を沈殿させた。DNA断片(沈殿)を遠心により回収し、DNAを乾燥させた後10μlの滅菌水に溶解し、エリスロポエチン遺伝子溶液とした。

一方、シャトルベクターpKSV-10 2μl(4μlのTE-緩衝液に溶解)に5倍濃度のBgl II反応緩衝液及びBgl II 10単位を加え、37℃ 1時間反応をさせ、開環した。この反応液をフェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回の処理を行い、DNAを乾燥させた後、10μlのTE緩衝液に溶解し、10μlの5倍濃度CIP反応緩衝液(250mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM ZnCl<sub>2</sub>、5mM spermidine pH 9.0)、28μlの滅菌水、24単位のCIP(calf intestinal alkaline phosphatase)を加え、37℃ 30分反応させた。その後、さらに24単位のCIPを加え、37℃で30分間反応させ2回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出、1回のエ

#### 実施例1

#### エリスロポエチン形質導入ベクター(pSVhEPX)の作成

58μlのTE-緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH 7.4)に溶解したプラスミドpHP 1425(プラスミドpUC 8のEcoRI、SmaI切断部位にエリスロポエチンゲノム遺伝子を挿入したもの;大きさ5.3 kb)4μgに対し、5倍濃度のBgl II反応緩衝液(50mM Tris-HCl、35mM MgCl<sub>2</sub>、500mM NaCl、35mMメルカプトエタノール)20μlを加えた後、各10単位の制限酵素Bgl II及びBamHIを加え、37℃で2時間反応した後、3.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、2.6kbのBgl II-BamHI断片(エリスロポエチン遺伝子)に相当するゲルの部位を切り出し、ゲルを微細に破砕した後、溶出用緩衝液(0.5M酢酸アンモニウム、1mM EDTA、0.1% SDS pH 8.0)を0.5ml加え、37℃で1晩インキュベートし、DNAの抽出を行った。DNAは遠心によりアクリルアミドゲルを沈降させ、上層の

エタノール沈殿の処理を行い、DNAを乾燥し、10μlの滅菌水に溶解してBgl II切断CIP処理pKSV-10溶液とした。

100ng(ナノグラム10<sup>-9</sup>g)のBgl II切断CIP処理pKSV-10(2μlの水に溶解)に、100ngのエリスロポエチン遺伝子(8μlの水に溶解)、1μlの10倍濃度ligation反応緩衝液(660mM Tris-HCl、66mM MgCl<sub>2</sub>、100mM DTT、pH 7.6)、1μlの9mM ATP及び1.5μlのT4 DNA ligase(4.2単位)を加え(最終DNA末端濃度10.9 pmol/ml)4℃で1晩反応を行った。反応液を2回フェノール抽出、3回エーテル抽出、1回のエタノール沈殿の処理を行ったのち、DNAを乾燥させ20μlのTE-緩衝液に溶解して、形質転換用DNA溶液とした。そのDNA溶液10μlを用いて200μlの大腸菌DH-1コンピテント(competent)細胞を形質転換した。用いたDH-1コンピテント細胞の形質転換頻度はpBR 322 DNA 1μgあたり1.0×10<sup>6</sup>個であつた。以上の操作により46株の

アンピシリン耐性形質転換株を得た。うち、16株について、プラスミドの制限酵素切断地図解析を行い、目的とするエリスロポエチン形質導入ベクターを有する3株を選択した。さらに、うち1株を用い常法に従いプラスミド調製を行いエリスロポエチン形質導入ベクター(pSVhEPX)を調製した。尚、本ベクターの動物細胞におけるエリスロポエチン遺伝子の発現は、COS細胞を用いるトランジェントエクスペリメンテーションを行うことにより確認した。

#### 選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターの作成

10  $\mu$ l の TE-緩衝液に溶解した 2.5  $\mu$ g のプラスミド pNEO に対し、10倍濃度の Hind III 反応緩衝液(100mM Tris-HCl、100mM MgCl<sub>2</sub>、500mM NaCl、10mM DTT、pH 7.5) 10  $\mu$ l、滅菌水76  $\mu$ l を加えた後、50単位の Hind III を加え、37℃で2時間反応した後、1回フェノール抽出、3回エーテル抽出、エタノール沈殿1回の処理を行い、DNAを乾燥させた後、50  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。本溶

液よりDNA断片を分離し、1496 bp の neo遺伝子に相当するゲルの部位を切り出し、ゲルを微細に破砕した後溶出用緩衝液 400  $\mu$ l を加え、37℃で1晩の抽出を行つた。遠心によりアクリルアミドゲルと水層とに分け、水層をフェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回を行いDNAを精製した。

50ngの neo遺伝子(19  $\mu$ l の水に溶解)と、110  $\mu$ g の Bgl II 切断 CIP処理pKSV-10(4  $\mu$ l の水に溶解)に10倍濃度の ligation 反応緩衝液 3  $\mu$ l、9mM ATP 溶液 1.2  $\mu$ l 及び 2  $\mu$ l の T4-DNA ligase(5.6 単位)を加え4℃1晩の反応を行つた。

反応液を2回フェノール抽出、3回エーテル抽出、1回のエタノール沈殿の処理を行つたのち、DNAを乾燥させ、20  $\mu$ l の TE-緩衝液に溶解し、形質転換用DNA溶液とした。その溶液 5  $\mu$ l を用いて 200  $\mu$ l の大腸菌 DH-1 コンピテント細胞に形質転換した。

液に10倍濃度の Klenow 反応緩衝液(500mM Tris-HCl、100mM MgSO<sub>4</sub>、1mM DTT、500  $\mu$ g/ml BSA)、25  $\mu$ l の 2mM dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTPの混合液)、滅菌水 113  $\mu$ l および10単位の Klenow 酵素(DNA polymerase I large fragment)を加え、22℃で30分間反応を行い、5'末端突起部位の修復を行つた。フェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回の処理を行い、DNAを乾燥させ、10  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。次に、3  $\mu$ g の BamHIリンカー(d(pCGGATCCG)、1  $\mu$ l の水に溶解)、10倍濃度の ligation 反応緩衝液 3  $\mu$ l、滅菌水16  $\mu$ l 及び 4  $\mu$ l の T4-DNA ligase(11.2単位)を加え、22℃6時間の反応を行つた。フェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回の処理の後、DNAを乾燥させ、80  $\mu$ l の滅菌水に溶解し、5倍濃度の Bgl II 反応緩衝液20  $\mu$ l、50単位の BamHIを加えて、37℃で3時間の反応を行つた。本反応液を3.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことに

(形質転換頻度  $3 \times 10^4$  個/ $\mu$ g pBR322)。以上の操作により21株のアンピシリン-カナマイシン耐性形質転換株を得た。うち11株についてプラスミドの制限酵素切断地図解析を行い、正確な方向に neo遺伝子の挿入された選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターを有する4株を選択した。さらに、うち1株を用いて、常法に従いプラスミド調製を行い選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター(pKSV Neo)を調製した。尚本ベクターの動物細胞における neo遺伝子の発現は L-929細胞への neo遺伝子の形質導入を行い、G-418 耐性細胞の生成により確認した。

#### L-929 細胞へのエリスロポエチン遺伝子の導入

$2 \times 10^4$  個のマウス L-929細胞を25cm<sup>2</sup>-フラスコに播種し、翌日、リン酸カルシウム法によるDNAトランスフェクションを行つた。トランスフェクションは、エリスロポエチン形質導入ベクター-pSVhEPX 及び選択マーカー neo<sup>r</sup> 形質導入ベクター-pSV Neo を用いたコトランスフェクション法

により行つた。すなわち、2.5  $\mu$ g の環状 pSV Neo 及び 22.5  $\mu$ g の環状 pSVhEPX を 22  $\mu$ l の TE-緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、500  $\mu$ l の isotonic HEPES Saline (137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM リン酸 2 ナトリウム、6mM グルコース、21mM HEPES) を加えた後、33.3  $\mu$ l の 2M 塩化カルシウム液を徐々に攪拌しながら滴下後、20 分間室温に放置し DNA-リン酸カルシウム液を調製した。

先に調製した L-929 細胞の培養液 (Eagle's MEM (Earle's salt) + 10% FCS) を取り除き、DNA-リン酸カルシウム液 500  $\mu$ l を加え室温で 20 分間放置後 4ml 150  $\mu$ M のクロロキンを含む培養液を加え、4 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーション後、培養液で洗浄した後、15% グリセロールを含む isotonic HEPES Saline 2ml を加え室温で 3 分間インキュベートし、培養液で洗浄後、新たに 4ml の培養液を加え培養した。2 日後、80cm<sup>2</sup> T-フラスコ 2 本に播種しなおした (1/6 split)。100 単位/10<sup>4</sup> cell/day であつた。翌日、400  $\mu$ g/ml の G 418 を含む培養液に取り換

え、適時メジウム交換を行い、G 418 耐性細胞を選別した結果、13 日後に G 418 耐性株 7 株を得た。

3 日後、96 穴マイクロウエル 1 枚に 50 個の細胞を播種する限界希釈法を行い、適時 G 418

400  $\mu$ g/ml を含む培養液を取り替え、16 日後に 45 ウエルにコロニーを見出した。これら 45 ウエル中の培養上清に含まれるエリスロポエチン活性をラジオイムノアッセイ法により調べた結果、38 ウエルに活性を見出した。そのうち、高いエリスロポエチン量を示した 6 ウエルの細胞を選出し、

G 418 含有下で増殖を行い、再度同様にして限界希釈を行いエリスロポエチンを恒常的に生産する細胞株を樹立し、L-929 SVhEP 001 と命名した。

尚、L 929 SVhEP 001 のエリスロポエチン生産量をラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用い、CFU-E 形成を行う in vitro バイオアッセイ法で調べた結果、両者は同一の活性を示し、100 単位/10<sup>4</sup> cell/day であつた。

#### 実施例 2

本例では、環状の形質導入ベクターを用いた L-929 へのエリスロポエチン遺伝子の導入の態様を示す。

エリスロポエチン形質導入ベクター pSVhEPX 及び選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターは、実施例 1 で作成したものをを使用した。

#### 環状形質導入ベクターの作成

2.5  $\mu$ g の pKSV Neo (2.1  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解) 及び 22.5  $\mu$ g の pSVhEPX (19.8  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解) に 2 倍濃度の EcoRI 反応緩衝液 (100mM Tris-HCl、14mM MgCl<sub>2</sub>、200mM NaCl、14mM 2-メルカプトエタノール、0.02% BSA) 110  $\mu$ l、滅菌水 68  $\mu$ l 及び EcoRI 5  $\mu$ l (100 単位) を加え、37℃ で 2 時間反応させた後、フェノール抽出 1 回、エーテル抽出 3 回、エタノール沈殿 1 回の処理を行い、DNA を乾燥させた後、22  $\mu$ l の TE-緩衝液に溶解し、DNA 溶液とした。

#### L-929 細胞へのエリスロポエチン遺伝子の導入

実施例 1 に記載したと同様な手順で行つた。す

なわち、2 $\times$ 10<sup>4</sup> 個のマウス L-929 細胞を DNA トランスフェクションの前日に 25cm<sup>2</sup> T-フラスコに播種し、上記 DNA 溶液を用い L-929 細胞ヘリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。G 418 耐性細胞を選別した結果、耐性株 10 株を得た。本株を用い、2 回の限界希釈法を用いた細胞のクローン化を行い、エリスロポエチンを恒常的に生産する細胞株を樹立し、L-929 SVhEP 002 と命名した。尚、本株のエリスロポエチン生産量は、ラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いた CFU-E 形成 in vitro バイオアッセイ法で調べた結果、先と同様に 100 単位/10<sup>4</sup> cell/day であつた。

#### 実施例 3

##### 無血清培地によるエリスロポエチンの生産

実施例 1 において作成した L-929 SVhEP 001

1.5 $\times$ 10<sup>7</sup> cell を 600cm<sup>2</sup> のセルフアクトリーシグムトレイ (シンク社製) に播種し、血清を含む培地 200  $\mu$ l (Eagle's MEM (Earle's salt) + 10%

FCS)中で1日培養した後、無血清培地に交換し、  
3日間培養し、さらに無血清培地に交換し3日間  
培養し、無血清培養上清をそれぞれ200mℓを得た。

本培地中に含まれるエリスロポエチン活性をラ  
ジオイムノアッセイ法で定量した結果12単位/mℓ  
であつた。

出願人 雪印乳業株式会社

代理人 宮 田 広 豊